eDNA 监测数据分析中的参考数据库选择、指标阈值选择、目标数据准备——以鱼类为监测目标*

许兰馨 [1,2]，杨海乐 [1]**，刘志刚 [1]，杜 浩 [1]
（1.中国水产科学研究院长江水产研究所，农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室，湖北 武汉 430223
2.南京农业大学无锡渔业学院，江苏 无锡 214000）

摘 要：基于宏条形码（meta-barcoding）的 eDNA 监测技术路径中，eDNA 测序数据的分析和注释是后续结果判断和评估的基础。其中，参考数据库选择、指标阈值选择、目标数据准备是其中最为关键的三个细节。为了了解和检验这三个细节的处理方案的影响，我们以长江中游 2 组 eDNA 监测 *COI* 基因序列数据为分析对象，针对鱼类的检出做了三组实验来分别检验 1）参考数据库及各物种参考序列丰富度对注释结果的影响，2）OTU 聚类序列相似度和物种注释分类置信度对注释结果的影响，3）目标数据中各物种序列丰富度对注释结果的影响。结果显示：1）更新版本 nt 库注释出的结果有向好趋势但不明显，每个物种的参考序列丰富度越高注释出的结果越全面，建议构建尽可能全面地覆盖本地物种和各物种内的核苷酸变异的本地参考数据库；2）OTU 聚类序列相似度阈值越高获得的 OTU 越精细，注释分类置信度阈值越高注释结果越精确，此两者有联动，针对 *COI* 基因 320 bp 的序列片段，0.99 和 0.9 分别是其两者的推荐值；3）目标数据中各物种序列丰富度越高注释结果越全面，建议实践应用中增加监测目标区域的时空差异性重复采样。

关键词：环境 DNA，宏条形码，参考数据库，OTU 聚类序列相似度，物种注释分类置信度，阈值，长江中游，鱼类

Reference database selection, index threshold selection and target data preparation in the sequence data analysis of eDNA monitoring -- taking fish as the target

Xu Lanxin [1,2], Yang Haile [1]**, Liu Zhigang [1] & Du Hao [1]
(1. *Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan* 430223, *P.R.China*
2. *Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi* 214000, *P.R.China*)

Abstract: In meta-barcoding based eDNA monitoring technology, analysis and annotation of eDNA sequencing data is the basis for subsequent results judgment and evaluation. Among them, reference database selection, indicator threshold selection and target data preparation are the three most critical details. In order to understand and test the treatment of these three details and their influences, we took two sets of *COI* gene sequence data from eDNA monitoring in the middle reach of the Yangtze River as the analysis objects, and conducted three sets of experiments on fish detection to test 1) the influence of different reference databases and different reference sequence richness of each species on annotation results; 2) the influence of different OTU cluster sequence similarity and different species annotation classification confidence on annotation results; 3) the influence of different sequence richness of each species in the target sequence data sets on annotation results. The results showed that 1) there was little difference in annotated results among different versions of nt libraries from NCBI, and the higher the richness of reference sequence of each species, the more comprehensive annotated

* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项（YFI202201）、农业农村部财政专项“长江禁捕后常态化监测”资助。

results. It is suggested to construct a local reference database covering all the native species and all the nucleotide variation of each species. 2) The higher the similarity threshold of OTU clustering sequence, the finer OTU will be, and the higher the annotation classification confidence threshold, the more accurate annotation results will be. For the 320 bp target sequence fragments of *COI* gene in fishes, 0.99 and 0.9 are the recommended values respectively. 3) The higher the sequence richness of each species in the target sequence data, the more comprehensive the annotation results. It is suggested to increase the different temporal and spatial repeated samples in the monitoring target area in practical application.

Keywords: environmental DNA; meta-barcoding; reference database; OTU clustering sequence similarity; species annotation classification confidence; threshold; middle Yangtze River; fish

eDNA (environmental DNA)是指从环境样品（水体、土壤、沉积物、空气、混合物等）中提取的 DNA，是各种生物的 DNA 混合物[1-3]。从环境样品中提取 eDNA，用特定 DNA metabarcoding 引物对其进行扩增测序、分类学分析、相对丰度分析、功能预测等，可以监测环境中物种组成、群落结构、生态功能等相关信息[3-5]。近年来随着 metabarcoding 技术的成熟、二代测序技术成本的下降[3]，开展 eDNA 监测工作有向常态化发展的趋势[6]，其中在禁捕水域针对鱼类物种组成及资源的 eDNA 监测的需求最为迫切。

实现 eDNA 监测工作常态化的前提是实现 eDNA 监测的标准化[7, 8]。eDNA 监测技术链条中，eDNA 测序结果的分析注释是整个监测工作后续结果判断和评估的基础[3]，其中参考数据库选择、阈值指标选择、目标数据准备是其中最为关键的三个需要标准化的细节。这三个细节虽然先前已有整体性论述[3]，先前的案例研究也都有自己的选择（参考数据库以 NCBI 的 nt 数据库为主，小部分进行自建本地参考数据库；OTU 聚类的序列相似度以 0.97、0.99 为主，也有用 0.95、0.98、1.00 的；物种注释中的序列覆盖度取值有 0.80、0.85、0.95，序列一致性取值有 0.95、0.96、0.97、0.99、1.00；也有不少研究不标明相关细节参数；随机抽取的一些案例研究相关信息见附表 1），但要满足具体的标准化，尚需具体定量比较分析。

针对这三个细节的标准化需求，本研究以长江中游 2 组 eDNA 监测 *COI* 基因序列数据为分析对象，针对鱼类的检出做了三组实验来分别检验 1）参考数据库及各物种参考序列丰富度对注释结果的影响，2）OTU 聚类序列相似度和物种注释分类置信度对注释结果的影响，3）目标数据中各物种序列丰富度对注释结果的影响，并尝试给出相关建议。

1 材料方法

1.1 两个数据集的来源

2020 年 6 月在长江中游的 30 个采样断面采集 eDNA 样品，委托上海美吉生物医药科技有限公司用线粒体 *COI* 基因的扩增子（引物为 mlCOIintF/jgHCO2198R）进行二代高通量测序，获得长江中游 eDNA 数据集[9]。2020 年 9 月在长江武汉江段的 1 个采样断面连续 13 天采集 eDNA 样品，委托上海美吉生物医药科技有限公司用线粒体 *COI* 基因的扩增子（引物为 mlCOIintF/jgHCO2198R）进行二代高通量测序，获得长江中游 eDNA 数据集[10]。相关序列原始数据已存于国家基因库生命大数据平台（China National GeneBank DataBase, CNGBdb, https://db.cngb.org/）的长江中游 eDNA 序列文件夹中（项目编号: CNP0002410，DOI: 10.26036/CNP0002410）。

1.2 本地数据库的构建

根据“长江渔业资源与环境调查（2017-2021）”所整理出的长江鱼类名录[11]，在 NCBI 数据库中搜集各物种的线粒体 *COI* 基因序列，并基于 2021 年在长江渔业资源与环境调查中所捕捞采集的各种鱼类的鳍条样品，通过 DNA 提取、用线粒体 *COI* 基因的宏条形码引物 mlCOIintF/jgHCO2198R 进行 PCR 扩增、

送武汉天一辉远生物科技有限公司进行序列测定，获得相关鱼类物种的线粒体 *COI* 序列，整合构建本地针对长江中游鱼类的线粒体 *COI* 基因的宏条形码引物 mlCOIintF/jgHCO2198R 参考数据库。本地参考数据库包括从 NCBI 搜集获得的长江物种名录中 236 个物种共 1741 条线粒体 *COI* 序列（截至 2022 年 3 月），以及本研究自行扩增、测序所得的 115 种共 299 条线粒体 *COI* 序列，共计 281 种 2040 条序列，隶属于 18 目 41 科 149 属（附表 2）。

1.3 不同参考数据库的注释结果对比

利用美吉生物云平台(www.majorbio.com)2022 年更新的分析计算模块，对长江中游 eDNA 监测 *COI* 数据、长江武汉段 eDNA 监测 *COI* 数据进行质控、拼接(用 FLASH version 1.2.11 https://ccb.jhu.edu/software/FLASH/index.shtml)、OTU 聚类(用 UPARSE version 7.0.1090 http://drive5.com/uparse/，取 99%的序列相似度)、物种注释(分别比对 NCBI 核酸序列数据库 nt_v20200604、nt_v20210917 库、nt_v20221012 库，采用 Blast 算法，取 90%的分类置信度，即序列一致性和序列覆盖度阈值均取 90%)，获得注释结果，筛选出硬骨鱼纲(Actinopteri)结果，进行不同参考数据库所获得注释结果的对比分析。

1.4 各物种不同参考序列丰富度的注释结果对比

将本研究所构建的本地参考数据库命名为本地多序列参考库，从本地多序列参考库中针对每一个物种随机抽取一条参考序列构建本地单序列参考库。利用美吉生物云平台(www.majorbio.com)2022 年更新的分析计算模块，对长江中游 eDNA 监测 *COI* 数据、长江武汉段 eDNA 监测 *COI* 数据进行质控、拼接(用 FLASH version 1.2.11 https://ccb.jhu.edu/software/FLASH/index.shtml)、OTU 聚类(用 UPARSE version 7.0.1090 http://drive5.com/uparse/，取 99%的序列相似度)、物种注释(分别比对本地单序列参考库、本地多序列参考库，采用 RDP classifier 贝叶斯算法 version 2.11 https://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/，取 90%的分类置信度)，获得注释结果，进行不同参考数据库所获得注释结果的对比分析。

1.5 不同 OTU 聚类序列相似度和物种注释分类置信度的注释结果对比

利用美吉生物云平台(www.majorbio.com)2022 年更新的分析计算模块，对长江中游 eDNA 监测 *COI* 数据、长江武汉段 eDNA 监测 *COI* 数据进行质控、拼接(用 FLASH version 1.2.11 https://ccb.jhu.edu/software/FLASH/index.shtml)、OTU 聚类(用 UPARSE version 7.0.1090 http://drive5.com/uparse/)、物种注释(分别比对 NCBI 核酸序列数据库 nt_v20221012 库，采用 Blast 算法)，基于 OTU 聚类序列相似度和物种注释分类置信度的取值规则及常用取值，对 OTU 聚类序列相似度和物种注释分类置信度（即序列一致性和序列覆盖度，两者取同一个值）取值设定 5 个组合，0.999 & 0.99、0.999 & 0.9、0.99 & 0.9、0.97 & 0.8、0.9 & 0.8，获得注释结果，筛选出硬骨鱼纲(Actinopteri)结果，进行不同参考数据库所获得注释结果的对比分析。

1.6 目标数据中各物种不同序列丰富度的注释结果对比

基于本研究所构建的本地单序列参考库、本地多序列参考库分别构建两个目标数据。考虑到在分析计算步骤中的 OTU 聚类环节默认去除无重复序列，所以在构建目标数据过程中对参考序列进行了 7 倍重复。利用美吉生物云平台(www.majorbio.com)2022 年更新的分析计算模块，对所构建的两个目标数据进行质控、拼接(用 FLASH version 1.2.11 https://ccb.jhu.edu/software/FLASH/index.shtml)、OTU 聚类(用 UPARSE version 7.0.1090 http://drive5.com/uparse/)、物种注释(分别比对 NCBI 核酸序列数据库 nt_v20221012 库，采用 Blast 算法)，对 OTU 聚类序列相似度和物种注释分类置信度（即序列一致性和序列覆盖度，两者取同一个值）取值设定 2 个组合，0.999 & 0.9、0.99 & 0.9，获得注释结果，筛选出硬骨鱼纲(Actinopteri)结果，进行不同参考数据库所获得注释结果的对比分析。

2 结果

2.1 参考数据库及各物种参考序列丰富度对注释结果的影响

针对两个数据集进行的三个 nt 参考数据库注释结果对比分析显示，三个 nt 参考数据库注释结果差异不大，但整体上来说最新版的 nt 参考数据库注释结果会趋势性更好（表 1）。针对两个数据集进行的两个本地参考数据库注释结果对比分析显示，参考库中每个物种的参考序列越丰富对物种内序列变异覆盖越全，能够比对得上的 OTU 数量越多（即比对脱靶的越少），所得注释结果也越全面（表 2）。

表 1 不同版本 nt 参考数据库对注释结果的影响

Table 1 The influence of different visions of nt reference databases from NCBI on annotation results

数据集	参考数据库	OTU 聚类序列相似度	物种注释分类置信度	注释所得鱼类物种数	注释所得鱼类 OTU 数
长江中游 eDNA 监测 CO1 数据	nt_v20200604 库	0.99	0.9	25	44
	nt_v20210917 库	0.99	0.9	29	47
	nt_v20221012 库	0.99	0.9	28	48
长江武汉段 eDNA 监测 CO1 数据	nt_v20200604 库	0.99	0.9	30	87
	nt_v20210917 库	0.99	0.9	31	85
	nt_v20221012 库	0.99	0.9	31	86

注：物种注释分类置信度，即用 Blast 算法的序列一致性和序列覆盖度，两者取同一个值

表 2 各物种参考序列丰富度对注释结果的影响

Table 2 The influence of different reference sequence richness of each species on annotation results

数据集	参考数据库	OTU 聚类序列相似度	物种注释分类置信度	注释所得鱼类物种数	注释所得鱼类 OTU 数
长江中游 eDNA 监测 CO1 数据	本地单序列参考库	0.99	0.9	22	46
	本地多序列参考库	0.99	0.9	26	129
长江武汉段 eDNA 监测 CO1 数据	本地单序列参考库	0.99	0.9	25	65
	本地多序列参考库	0.99	0.9	33	291

2.2 OTU 聚类序列相似度和物种注释分类置信度对注释结果的影响

对不同 OTU 聚类序列相似度和物种注释分类置信度取值组合所获得的硬骨鱼纲注释结果对比分析结果显示，OTU 聚类序列相似度阈值越高，所获得的相应 OTU 数量越多，物种注释分类置信度阈值越高，相关 OTU 匹配到相应参考序列上的越少（表 3）。整体来看，OTU 聚类序列相似度和物种注释分类置信度取值组合为 0.999 & 0.9 和 0.99 & 0.9 时，能够获得相对充分的 OTU 和相对全面的物种（表 3）。

表 3 OTU 聚类序列相似度和物种注释分类置信度对注释结果的影响

Table 3 The influence of different OTU cluster sequence similarity and different species annotation classification confidence on annotation results

数据集	参考数据库	OTU 聚类序列相似度	物种注释分类置信度	注释所得鱼类物种数	注释所得鱼类 OTU 数
长江中游 eDNA	nt_v20221012 库	0.999	0.99	26	201

监测 CO1 数据	nt_v20221012 库	0.999	0.9	26	238
	nt_v20221012 库	0.99	0.9	28	48
	nt_v20221012 库	0.97	0.8	27	27
	nt_v20221012 库	0.9	0.8	19	19
长江武汉段 eDNA 监测 CO1 数据	nt_v20221012 库	0.999	0.99	26	160
	nt_v20221012 库	0.999	0.9	26	167
	nt_v20221012 库	0.99	0.9	31	86
	nt_v20221012 库	0.97	0.8	30	36
	nt_v20221012 库	0.9	0.8	16	16

注：物种注释分类置信度，即用 Blast 算法的序列一致性和序列覆盖度，两者取同一个值

2.3 目标数据中各物种序列丰富度对注释结果的影响

基于本地单序列参考库、本地多序列参考库所构建的两个目标数据开展的 OTU 聚类和物种注释分析对比结果显示，目标数据中各物种的序列丰富度越高，注释所得的物种越全面（表 4）。同时，结果也验证 OTU 聚类序列相似度越高，所获得的 OTU 越精细，OTU 数量也越多，进而注释所得的物种也越全面，在算力允许的情况下 OTU 聚类序列相似度和物种注释分类置信度取值组合推荐 0.999 & 0.9 和 0.99 & 0.9 都尝试分析计算一下，最后取最优值（表 4）。

表 4 目标数据中各物种序列丰富度对注释结果的影响

Table 4 The influence of different sequence richness of each species in target sequence data on annotation results

数据集	OTU 聚类序列相似度	物种注释分类置信度	注释所得鱼类物种数	注释所得鱼类 OTU 数
本地单序列参考库-7 倍重复（281 个物种，281 条序列，7 倍重复）	0.999	0.9	257	271
	0.99	0.9	240	248
本地多序列参考库-7 倍重复（281 个物种，2040 条序列，7 倍重复）	0.999	0.9	275	853
	0.99	0.9	257	444

注：物种注释分类置信度，即用 Blast 算法的序列一致性和序列覆盖度，两者取同一个值

3 讨论

如果物种注释使用 NCBI 的 nt 库，推荐使用最新版本，如果使用本地参考数据库，建议本地参考数据库尽可能全面地覆盖本地物种及各物种内的核苷酸变异。NCBI 的 nt 库有更新，虽然更新有限，但更新版的 nt 参考数据库注释结果会趋势性更好，推荐使用最新版本（表 1）。相比截至目前长江有记录的 458 种（包括外来种）鱼类[11]，nt 库中还有 222 种鱼类缺少线粒体 *COI* 基因的扩增子（引物为 mlCOIintF/jgHCO2198R）对应的参考序列，某些物种虽然已经有了相关参考序列，但整体上序列数量还比较少。如果参考序列未能有效覆盖该物种的种内变异，就容易导致在比对注释过程中目标序列的脱靶（表 2）。为了克服 nt 库中参考序列的不足，可以构建本地参考数据库，较快速便捷地更新补充相关物种的参考序列，尽可能全面地覆盖各物种的种内变异。在本地数据库构建方面，南京农业大学等 10 余所高校及科研院所合作构建的中国淡水大型底栖无脊椎动物条形码数据库是类似工作的先行者[12]。本研究所试验性初步构建的长江鱼类条形码本地参考数据库将作为共享本地数据库供各相关研究者使用（【金山文档】 长江鱼类 COI 基因条形码-持续更新 https://kdocs.cn/l/ca4C2LV28QU7，以所有人可访问可下载可编辑的在线

文档形式简单共享，执行 CC-BY-4.0 协议），后续我们将基于我们已有的长江鱼类标本库持续补充各长江鱼类的参考序列，也欢迎各相关研究者对相关参考序列进行持续补充。

OTU 聚类序列相似度和物种注释分类置信度建议分别取 0.99 & 0.9，如果算力允许，可同时取 0.999 & 0.9 这个参数组合，然后用两组参数组合结果中的最优者。不同类群物种间的差异程度有差异，不同物种内的变异程度也有差异，所以在 OTU 聚类和物种注释过程中所适宜的参数设置也会有差异。比如针对细菌的线粒体 16S rRNA 基因的参数取值（比如 0.97 & 0.8 [13]）通常低于针对真核生物的 *COI* 基因的参数取值（比如 0.99 & 0.97 [10]）。OTU 聚类时序列相似度设置越高，聚类形成的 OTU 数目就越多[3]。序列比对注释的分类置信度设置得偏低，往往会出现把某一物种的序列错误匹配到序列相似的另一物种上；序列比对注释的分类置信度设置得很高，往往会出现一些通过比对无法与参考数据库中的任一序列形成匹配的 OTU 序列[3]。本研究针对鱼类（*COI* 基因上的 320 bp 大小的片段），对 OTU 聚类序列相似度和物种注释分类置信度取值设了 5 个组合，0.999 & 0.99、0.999 & 0.9、0.99 & 0.9、0.97 & 0.8、0.9 & 0.8，最终研究结果显示（表 3），0.99 & 0.9 可能是相对合适的 OTU 聚类序列相似度和物种注释分类置信度取值组合，在算力允许的情况下 OTU 聚类序列相似度和物种注释分类置信度取值组合推荐 0.999 & 0.9 和 0.99 & 0.9 都尝试分析计算一下，最后取最优值。

进行有一定时空差异的重复采样增加目标数据的丰富度，可获得更全面的注释结果。对于关注鱼类种类组成的 eDNA 监测来讲，核心在于检出相关物种，无论是通过提升参考序列的丰富度覆盖尽可能多的种内变异，使得 eDNA 所监测到的各物种的特定变异序列都能够找到可匹配的参考序列（表 2），还是通过提升 eDNA 所监测到的各物种的种内变异数量，使得 eDNA 所监测到的各物种的种内变异中总有一个或者几个能够匹配到参考序列上（表 4），都能够达到物种检出的目的。因此对于目标区域目标物种存在一定种内变异，同时参考数据库里的参考序列对种内变异的覆盖度不是很高的情况下，可以通过增加目标区域的时空差异性重复采样，以增加目标数据的丰富度以获得更全面的注释结果。

参考文献

[1] Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, *et al.*. Environmental DNA. *Molecular Ecology*. 2012, **21**(8): 1789-1793. 10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x

[2] Pawlowski J, Apothéloz-Perret-Gentil L, Altermatt F. Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*. 2020, **29**(22): 4258-4264. https://doi.org/10.1111/mec.15643

[3] Yang HL, Zhang H, Du H. A framework for standardizing the processes of eDNA monitoring and an accessible vision of the future. *Journal of Lake Sciences*. 2023, **35**(1): 12-31. 10.18307/2023.0100[杨海乐，张辉，杜浩. eDNA监测方法标准化框架及未来图景. *湖泊科学*. 2023, **35**(1): 12-31. 10.18307/2023.0100]

[4] Deiner K, Bik HM, Mächler E, *et al.*. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*. 2017, **26**(21): 5872-5895. 10.1111/mec.14350

[5] Coble AA, Flinders CA, Homyack JA, *et al.*. eDNA as a tool for identifying freshwater species in sustainable forestry: A critical review and potential future applications. *Science of the Total Environment*. 2019, **649**: 1157-1170. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.370

[6] Deiner K, Yamanaka H, Bernatchez L. The future of biodiversity monitoring and conservation utilizing environmental DNA. *Environmental DNA*. 2021, **3**(3): 3-7. https://doi.org/10.1002/edn3.178

[7] Dickie IA, Boyer S, Buckley HL, *et al.*. Towards robust and repeatable sampling methods in eDNA-based studies. *Molecular Ecology Resources*. 2018, **18**(5): 940-952. 10.1111/1755-0998.12907

[8] Nicholson A, Mcisaac D, Macdonald C, *et al.*. An analysis of metadata reporting in freshwater environmental DNA research calls for the development of best practice guidelines. *Environmental DNA*. 2020, **2**(3): 343-349. 10.1002/edn3.81

[9] Yang HL, Xu LX, Zhou Q, *et al.*. Quantifying the spatial resolution of eDNA monitoring: a case study in Middle Yangtze River in mean-flow period. *ChinaXiv*. 2023(202303): 8735. 10.12074/202303.08735V1[杨海乐，许兰馨，周琼等. eDNA监测空间分辨率量化的方法研究：以长江中游平水期为例. *ChinaXiv*. 2023(202303): 8735. 10.12074/202303.08735V1]

[10] Yang HL, Wu JM, Zhang H, *et al.*. Environmental DNA metabarcoding utilization efficiency in monitoring large river fish species composition: a case study in the Wuhan transect of the Yangtze River. *Journal of Fishery Sciences of China*. 2021, **28**(6): 796-807. 10.12264/JFSC2021-0556[杨海乐，吴金明，张辉等. 大型河流中鱼类组成的eDNA监测效率:以长江武汉江段为例. *中国水产科学*. 2021, **28**(6): 796-807. 10.12264/JFSC2021-0556]

[11] Yang HL, Shen L, He YF, *et al.*. Status of aquatic organisms resources and their environments in Yangtze River system (2017-2021). *Journal of Fisheries of China*. 2023, **47**(2): 3-30. 10.11964/jfc.20220913677[杨海乐，沈丽，何勇凤等. 长江水生生物资源与环境本底状况调查（2017-2021）. *水产学报*. 2023, **47**(2): 3-30. 10.11964/jfc.20220913677]

[12] Wang M, Yuan Y, Yu HY, *et al.*. Construction of Barcode Library of Freshwater Macroinvertebrate in China. *Environmental Monitoring of China*. 2022, **38**(1): 36-44. 10.19316/j.issn.1002-6002.2022.01.04[王萌，苑艺，于海燕等. 中国淡水大型底栖无脊椎动物条形码数据库构建. *中国环境监测*. 2022, **38**(1): 36-44. 10.19316/j.issn.1002-6002.2022.01.04]

[13] Ren Z, Wang F, Qu X, *et al.*. Taxonomic and Functional Differences between Microbial Communities in Qinghai Lake and Its Input Streams. *Frontiers in Microbiology*. 2017, **8**(2319): 2319. 10.3389/fmicb.2017.02319